

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平6-336428

(43) 公開日 平成6年(1994)12月6日

(51) Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 31/335	A B C	9454-4C		
37/64		8314-4C		
45/00		8415-4C		
// C 0 7 D 303/48				

審査請求 未請求 請求項の数 7 書面 (全 14 頁)

(21) 出願番号 特願平5-165854

(22) 出願日 平成5年(1993)5月27日

(71) 出願人 000002934

武田薬品工業株式会社

大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号

(71) 出願人 393017133

勝沼 信彦

徳島県徳島市名東町3丁目246番地の2

(72) 発明者 勝沼 信彦

徳島県徳島市名東町3丁目246番地の2

(72) 発明者 藤沢 幸夫

兵庫県神戸市東灘区御影中町4丁目1番31-104号

(74) 代理人 弁理士 岩田 弘 (外5名)

(54) 【発明の名称】 免疫抑制剤

(57) 【要約】

【目的】 エポキシコハク酸誘導体を含有する免疫抑制剤を提供する。

【構成】 カテプシンBが抗原プロセッシングに関与していることを見だし、該酵素阻害活性を有するエポキシコハク酸誘導体を含有する免疫抑制剤を創製した。

【効果】 本発明の免疫抑制剤は、カテプシンBの酵素活性を強く阻害することにより免疫惹起を抑制しうるので、各主の自己免疫疾患の治療薬として用いる事ができる。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】エポキシコハク酸誘導体を含有する免疫抑制剤。

【請求項2】カテプシンB阻害作用を有するエポキシコハク酸誘導体を含有する請求項1記載の免疫抑制剤。

【請求項3】エポキシコハク酸誘導体がエポキシコハク酸エステル誘導体である請求項1記載の免疫抑制剤。

【請求項4】エポキシコハク酸誘導体がエポキシコハク酸アミド誘導体である請求項1記載の免疫抑制剤。

【請求項5】エポキシコハク酸アミド誘導体がN-(L-3-トランス-n-プロピルカルバモイルオキシラン-2-カルボニル)-L-イソロイシル-L-プロリンである請求項4記載の免疫抑制剤。

【請求項6】エポキシコハク酸アミド誘導体が、N-(L-3-トランス-ε-トキシカルボニルオキシラン-2-カルボニル)-L-ロイシン-3-メチルブチルアミドである請求項4記載の免疫抑制剤。

【請求項7】自己免疫疾患治療剤である請求項1記載の免疫抑制剤。

## 【発明の詳細な説明】

【産業上の利用分野】本発明は免疫抑制剤に関するものである。さらに詳しくは、抗原プロセッシング酵素であるカテプシンを特異的に阻害する自己免疫疾患治療剤に関する。

【従来の技術】生体内における抗原の処理すなわち提示の機構は一般に以下のように考えられている。まず、抗原はエンドサイトーシスによってマクロファージ、樹状細胞、B細胞などの抗原提示細胞に取り込まれ、酸性画分のエンドゾームの分解酵素によって消化されて10個から20個ほどのアミノ酸からなる抗原ペプチドへと分解(Processing)される。次に、当該抗原ペプチドは細胞質内でクラスII主要組織適合遺伝子複合体(major histocompatibility complex: MHC)分子と複合体を形成する。最後に、当該複合体が抗原提示細胞膜上に発現される。CD4陽性ヘルパーT細胞がクラスII MHC分子に結合した抗原を認識し、活性化されて増殖し、それによってB細胞を刺激して分裂増殖させ、プラズマ細胞に分化させ抗体を分泌させる[矢野明彦、臨床免疫、22, 511-522(1990); 相沢志郎、臨床免疫、22, 523-533(1990); H. M. グレイ、A. セッテ、S. プース、Scientific American日本語版、20, 7-17(1990)]。ペプチド-MHC複合体を認識するT細胞抗原受容体(TCR-α, β鎖)及びこれをコードする遺伝子が解明され、またT細胞が反応するためには、抗原と自己のMHC産物の2種類の分子が認識されなければならないが、2本鎖TCRによってその抗原特異性及びMHC拘束性が決定されることが判明している。多数の抗原ペプチドがクラスII MHC分子と結合するために

は、抗原ペプチドは一定の規則構造を取ると考えられているが、それが何によって規定されているかは全く明らかでない。また、抗原の免疫学的フラグメントのプロセッシングに関与するプロテアーゼは今日まで明らかにされていない。

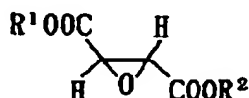
【発明が解決しようとする課題】上述のとおり、抗原は酸性画分のエンドゾームにおいてプロセッシングを受けて10個から20個ほどのアミノ酸に分解され、生じた短いペプチドがクラスII MHC分子と結合して細胞表面に提示される。この抗原のプロセッシングに関与する酵素の実体は今日まで不明であり、この段階を明らかにすることによってMHC分子と抗原との相互作用を解明し、これを抑制する医薬を開発することが望まれている。これらの解明は、自己の分子に対して免疫系が反応する自己免疫疾患の治療に道を開くものであり、具体的には慢性関節リウマチ、多発性硬化症、重症筋無力症、インスリン依存型糖尿病(I型糖尿病)、炎症性腸疾患、全身性エリトマトーデス、糸球体腎炎、自己免疫性溶血性貧血、橋本病、潰瘍性大腸炎、原発性胆汁性肝硬変、特発性血小板減少性紫斑病、交換性眼炎、悪性貧血、シェーグレン症候群、グッドパスチュア症候群などの治療薬の開発に結びつくものである。

【課題を解決するための手段】このような研究背景のもとに、本発明者らは特異性の高いプロテアーゼ阻害剤の投与によって抗原に対する特異的な抗体の産生が抑制されれば、抗原プロセッシングに関与するプロテアーゼを同定することができると考え、鋭意検討を行った結果、システインプロテアーゼ阻害剤、とりわけカテプシンB阻害剤であるエポキシコハク酸誘導体及び抗カテプシンB抗体が抗原の提示を阻害して特異的な抗体の産生を抑制することを見いだした。更に、カテプシンBの一次構造と三次元構造、及びクラスII MHC分子の一次構造を比較検討し、カテプシンBの活性中心の一つ、VN<sub>217-223</sub>(-VANSWNT-) (配列番号1)

は、クラスII MHC分子β鎖の結合ドメイン、VN<sub>87-98</sub>(-VAESWNS-) (配列番号2)と高い相同性を示し、その相同性の高い配列の中で、他のカテプシン類ではそれぞれリジン残基とグリシン残基である点が異なっているアラニン残基とアスパラギン残基がカテプシンBとクラスII MHC分子との間で同一のアミノ酸であることを見出し、カテプシンBがプロセッシングした抗原ペプチドがクラスII MHC分子に特異的に結合することにより抗原提示が行われるという予測を立てた[図1]。一方クラスII MHCβ鎖は抗原ペプチドのC末端ドメイン配列と親和性を示すことから、上記の予測に立つとこの親和性はカテプシンBの基質特異性によって規定されているといえる。そこで本発明者は、カテプシンBの分解によって生成される種々のペプチドについて検討を重ね、クラスII MHC分子に対して共通の親和性を示すペプチド配列を見だし、

抗原性提示ドメインは当該配列とそのN末端側に付加したペプチドから構成されていることを明らかにし本発明を完成するに至った。すなわち、本発明は、(1) エポキシコハク酸誘導体を含有する免疫抑制剤、(2) カテプシンB阻害作用を有するエポキシコハク酸誘導体を含有する上記(1)の免疫抑制剤および(3) 自己免疫疾患治療剤である上記(1)の免疫抑制剤である。本発明におけるエポキシコハク酸誘導体はそのカルボン酸が修飾されたものまたはその塩であって、分子内のチオール基が活性中心であると考えられるプロテアーゼ(チオールプロテアーゼ)の活性を阻害しう作用を有するものをいう。該エポキシコハク酸のカルボン酸誘導体としては、トランス型のエポキシコハク酸のモノまたはジエステル、ヒドロキサム酸、モノまたはジアミドが挙げられる。トランスエポキシコハク酸エステルとしては、式◎

【化1】

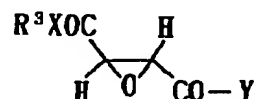


〔式中、R<sup>1</sup>およびR<sup>2</sup>は同一または互いに独立して、水素原子、置換されていてもよいアルキルまたは環状炭化水素基を示す。〕で示される化合物またはその塩が挙げられる。上記における置換されていてもよいアルキルとしては、置換基を有していてもよい環状炭化水素基で置換されていてもよい炭素原子数1~5の直鎖状または分枝鎖状アルキル基が挙げられ、置換されていてもよい環状炭化水素基で置換された直鎖状アルキル基が好ましい。また置換されていてもよい環状炭化水素基としては1~3の低級(C<sub>1-3</sub>)アルキル基、低級

(C<sub>1-3</sub>)アルコキシまたはハロゲン原子で置換されていてもよい1ないし3環性脂環式または芳香族炭化水素基が好ましく、なかでも1ないし3環性脂環式または芳香族炭化水素基がシクロアルキル基、シクロアルケニル基もしくはシクロアルカン基または単環式芳香族炭化水素基であるものが好ましく、とりわけ炭素原子数3~8のモノシクロアルキル基、炭素原子数6~8のビスシクロアルキル基、炭素数8~11のトリシクロアルキル基、炭素数5~8のモノシクロアルケニル基、炭素数5~8のビスシクロアルケニル基、炭素数6~9のモノシクロアルケン基、炭素数6~9のビスシクロアルケン基または炭素数5~7の芳香族炭化水素基であるものが好ましい。本発明においては、上記におけるR<sup>1</sup>またはR<sup>2</sup>が、同一もしくは互いに独立し、水素、置換されていてもよいC<sub>8-10</sub>アルキル基、置換されていてもよいC<sub>8-10</sub>モノシクロアルキル-C<sub>1-4</sub>アルキル基、C<sub>10</sub>トリシクロアルキル-C<sub>1-2</sub>アルキル基、C<sub>6-10</sub>モノシクロアルケンメチル基、C<sub>8-10</sub>ビスシクロアルケンメチル基、C<sub>4-8</sub>モノシクロアルキル基、置換されていてもよいC<sub>7</sub>ビスシクロアルキル基、C<sub>10</sub>トリシクロアルキル基、C<sub>8-10</sub>モノシクロアルケニル基

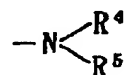
またはC<sub>8-10</sub>ビスシクロアルケニル基であるエポキシコハク酸またはその塩がとりわけ好ましく用いられ、これらの具体例としては、例えば、エポキシコハク酸シクロペンチルエステルカリウム塩、エポキシコハク酸シクロヘキシルエステルナトリウム塩、エポキシコハク酸ペンタメチルエステルカリウム塩、エポキシコハク酸シクロヘキサメチルエステルカリウム塩、エポキシコハク酸ノルボルニルエステルカリウム塩、エポキシコハク酸-2-アダマンチルエステルカリウム塩、エポキシコハク酸-4-シクロオクテニルエステルカリウム塩、エポキシコハク酸-3-シクロヘキサプロピルエステルカリウム塩、エポキシコハク酸ジ-4-シクロオクテンメチルエステルエポキシジ(トランス-2-クロル)シクロペンタンメチルエステル〔特開昭54-141735〕などが挙げられる。トランスエポキシコハク酸アミドとしては、式◎

【化2】



〔式中、R<sup>3</sup>は水素原子、単環式環状炭化水素または単環式環状炭化水素基で置換されていてもよい炭素数1~10の炭化水素、水素残基を示し、XはNまたはOを示し、Yは、置換されていてもよいアミノ基を示す〕で表わされる化合物である。ここにおける単環式環状炭化水素基としては、シクロアルキル基、シクロアルケニル基、シクロアルケン基、シクロアルカン基及び芳香族炭化水素基が挙げられ、さらにこれらが1~3のハロゲン原子、低級(C<sub>1-3</sub>)アルキルまたは低級アルコキシ基で置換されているものも含まれる。なかでも、炭素数5~6のシクロアルキル基、炭素数5~6のシクロアルケニル基、炭素数5~6のシクロアルカンおよび炭素数5~6の芳香族炭化水素基が好ましい。また、鎖状炭化水素基としては、直鎖状もしくは分枝状アルキル、アルケニルまたはアルキニルが挙げられ、好ましくはC<sub>1-6</sub>アルキル基、C<sub>2-4</sub>アルケニル基、C<sub>2-4</sub>アルキニル基であり、また単環式炭化水素で置換された鎖状炭化水素としては、C<sub>8-10</sub>シクロアルキル、C<sub>1-3</sub>アルキル基、C<sub>8-10</sub>シクロアルケン、C<sub>1-3</sub>アルキル基、C<sub>1-3</sub>アルケニル基が好ましい。置換されていてもよいアミノ基は、Nに結合手を有するアミノ酸または◎

【化3】



〔式中、R<sup>4</sup>及びR<sup>5</sup>は同一または独立して、水素原子、C<sub>1-3</sub>アルキル基、低級(C<sub>1-3</sub>)アルキルを介して結合していてもよく、かつ環構成基として1個のN、S、Oを有していてもよい1または2環性環状基、

N-カルボキシアミノC<sub>1-6</sub>-アルキルを示すか、またはR<sup>4</sup>及びR<sup>5</sup>は結合する窒素原子と共に5~6員の複素環基を形成する]で示される基を示す。ここにおいてアミノ酸とは、1または2のペプチド結合を有していてもよいアミノ酸、そのエステル、カルボキサミドおよび塩を示し、アミノ酸残基としてはL-α-アミノ酸特に天然のL-α-アミノ酸が好ましく、その具体例としてロイシン、イソロイシン、プロリン、トレオニン、チロジンおよびアルギニンなどが挙げられる。また、アミノ酸残基数が2個のものである具体例として、プロリルプロリン、トレオニルイソロイシン、チロジニルアルギニン、イソロイシルプロリン、イソロイシルアルギニンなどが挙げられる。上記でいうアルキル基は直鎖または分枝鎖状のいずれでもよい。環構成基としてN, S, Oを有していてもよい1または2環性環状基とは、具体的にシクロアルキル基(好ましくはC<sub>3-6</sub>-シクロアルキル)、シクロアルケニル基、シクロアルキニル基、C<sub>3-6</sub>-シクロアルカン、C<sub>1-6</sub>-アルキル基、アリール基(好ましくはフェニル)、アラルキル基(好ましくはベンジル基、フェネチル基など)、チエニル基、テニル基、フリル基、フルフリル基、ピリジニル基、キノリル基などを示し、さらにこれらの環状基は、1~3個のメチル基、トリフルオロメチル基、メトキシ基、ハロゲン原子、アセチル基、水酸基、ニトロ基、カルボキシ基、カルボエトキシ基などの置換基を有していてもよい。R<sup>2</sup>及びR<sup>3</sup>がその結合する窒素原子と共に形成する複素環基は、R<sup>2</sup>及びR<sup>3</sup>が結合する窒素原子以外にN, SまたはOのいずれか1個のヘテロ原子を有していてもよく、その具体例としてはピロリジン基、ピペラジノ基、モルホリノ基、チアモルホリノ基などが挙げられ、これらの複素環基はメチル基、カルボキシ基、カルボアルカリ金属オキシ基、カルボメトキシ基、カルボブトキシ基、カルボベンゾキシ基などで置換されていてもよい。エポキシコハク酸アミドの具体例としては、例えば、エチル N-フェニル-2, 3-エポキシスクシナメート、エチル N-2'-ピリジニル-2, 3-エポキシスクシナメート、エチル N-8'-キノリニル-2, 3-エポキシスクシナメート、エチル N-ベンジル-2, 3-エポキシスクシナメート〔特公昭55-47668〕、N-(DL-3-トランス-カルボキシオキシラン-2-カルボニル)-L-ロイシル-L-プロリンメチルエステル、N-[N'-(DL-3-トランス-カルボキシオキシラン-2-カルボニル)-L-ロイシル]フェネチルアミンカリウム塩〔特開昭55-115878〕、N-(L-3-トランス-カルボキシオキシラン-2-カルボニル)-L-ロイシルアグマチン〔アグリカルチュアル アンド バイオロジカル ケミストリー(Agric. Biol. Chem)第42巻、第523~528頁(1978年)〕、N-(L-3-トランス-カルボキシオキシラン-2-カルボニル)-L

10 ーチロシル-N-ニトロ-L-アルギニンベンジルエステル〔特開平2-304074〕、N-(L-3-トランス-エトキシカルボニルオキシラン-2-カルボニル)-L-プロリル-L-プロリン〔特開平2-304085〕、N-(L-3-トランス-エトキシカルボニルオキシラン-2-カルボニル)-L-イソロイシル-L-プロリン、N-(L-3-トランス-カルボキシオキシラン-2-カルボニル)-L-イソロイシル-L-プロリン、N-(L-3-トランス-エトキシカルボニルオキシラン-2-カルボニル)-L-イソロイシル-2-プロリンナトリウム塩、N-(L-3-トランス-メトキシカルボニルオキシラン-2-カルボニル)-L-イソロイシル-L-プロリン〔特開平3-42478〕、N-(L-3-トランス-n-プロピルカルバモイルオキシラン-2-カルボニル)-L-イソロイシル-L-プロリン(CA-074)、N-(L-3-トランス-n-ペプチルカルバモイルオキシラン-2-カルボニル)-L-イソロイシル-L-プロリン〔特開平4-139182〕などが挙げられる。これらのエポキシコハク酸誘導体のなかでも、カテプシンBに対して特異性の高い阻害効果を示すエポキシコハク酸アミノ酸アミド誘導体、特に2個のアミノ酸残基を有するエポキシコハク酸アミノ酸アミド誘導体またはその塩が好ましく用いられる。さらに該アミノ酸残基としては、イソロイシン、プロリンを用いることが好ましい。本発明のエポキシコハク酸誘導体は公知の化学合成法に準じて製造することができる。例えば、エポキシコハク酸エステル誘導体については、特開昭54-141735号公報、特公昭60-37105号公報記載の方法、エポキシコハク酸アミド誘導体については、特開昭55-47668号公報記載の方法、またエポキシコハク酸アミノ酸アミド誘導体については、特開平2-304074号公報、特開平2-304075号公報、特開平3-72478号公報、特開平4-139182号公報記載の方法に準じて製造することができる。本発明の免疫抑制剤は、有効量の上記エポキシコハク酸誘導体を単独または生理学的に許容される担体と配合し、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤などの固形製剤;またはシロップ剤、注射剤などの液状製剤として経口または非経口的に投与することができる。薬学的に許容される担体としては、製剤素材として慣用の各種有機あるいは無機担体物質が用いられ、固形製剤における賦形剤、滑沢剤、結合剤、崩壊剤;液状製剤における溶剤、溶解補助剤、懸濁化剤、等張化剤、緩衝剤、無痛化剤などとして配合される。また必要に応じて、防腐剤、抗酸化剤、着色剤、甘味剤などの製剤添加物を用いることもできる。賦形剤の好適な例としては、例えば乳糖、白糖、D-マンニトール、デンプン、結晶セルロース、軽質無水ケイ酸などが挙げられる。滑沢剤の好適な例としては、例えばステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸カルシウム、タルク、コロイ

ドシリカなどが挙げられる。結合剤の好適な例としては、例えば結晶セルロース、白糖、D-マンニトール、デキストリン、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビニルピロリドンなどが挙げられる。崩壊剤の好適な例としては、例えばデンプン、カルボキシメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースカルシウム、クロスカルメロースナトリウム、カルボキシメチルスターチナトリウムなどが挙げられる。溶剤の好適な例としては、例えば注射用水、アルコール、プロピレングリコール、マクロゴール、ゴマ油、トウモロコシ油などが挙げられる。溶解補助剤の好適な例としては、例えばポリエチレングリコール、プロピレングリコール、D-マンニトール、安息香酸ベンジル、エタノール、トリスアミノメタン、コレステロール、トリエタノールアミン、炭酸ナトリウム、クエン酸ナトリウムなどが挙げられる。懸濁化剤の好適な例としては、例えばステアリルトリエタノールアミン、ラウリル硫酸ナトリウム、ラウリルアミノプロピオン酸、レシチン、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、モノステアリン酸グリセリンなどの界面活性剤；例えばポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロース、ヒドロキシメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロースなどの親水性高分子などが挙げられる。等張化剤の好適な例としては、例えば塩化ナトリウム、グリセリン、D-マンニトールなどが挙げられる。緩衝剤の好適な例としては、例えばリン酸塩、酢酸塩、炭酸塩、クエン酸塩などの緩衝液などが挙げられる。無痛化剤の好適な例としては、例えばベンジルアルコールなどが挙げられる。防腐剤の好適な例としては、例えばパラオキシ安息香酸エステル類、クロロブタノール、ベンジルアルコール、フェネチルアルコール、デヒドロ酢酸、ソルビン酸などが挙げられる。抗酸化剤の好適な例としては、例えば亜硫酸塩、アスコルビン酸などが挙げられる。

【作用】本発明で用いられるエポキシコハク酸誘導体は、強いカテプシンB阻害作用と共に毒性が低いことが既に明らかになっている。したがって、本発明の免疫抑制剤は、哺乳動物（例、マウス、ラット、ウサギ、犬、ネコ、牛、豚、ヒト等）の各種自己免疫疾患の治療に安全に用いることができる。本発明製剤を自己免疫疾患治療剤として使用する場合、その投与量は、疾病の種類および状態、投与方法、投与対象の年齢、性別等により変動しうるが通常1日当りエポキシコハク酸誘導体として10~2000mgを1~数回に分けて投与することができる。なお、本願明細書や図面において、アミノ酸を略号で表示する場合、IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclatureによる略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を次に挙げる。また

アミノ酸に関して光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければL体を示すものとする。

G l y : グリシン (G)  
 A l a : アラニン (A)  
 V a l : バリン (V)  
 L' e u : ロイシン (L)  
 I l e : イソロイシン (I)  
 S e r : セリン (S)  
 T h r : スレオニン (T)  
 C y s : システイン (C)  
 1/2 C y s : ハーフシスチン  
 M e t : メチオニン (M)  
 G l u : グルタミン酸 (E)  
 A s p : アスパラギン酸 (D)  
 L y s : リジン (K)  
 A r g : アルギニン (R)  
 H i s : ヒスチジン (H)  
 P h e : フェニールアラニン (F)  
 T y r : チロシン (Y)  
 T r p : トリプトファン (W)  
 P r o : プロリン (P)  
 A s n : アスパラギン (N)  
 G l n : グルタミン (Q)

【実施例】以下に参考例および実施例を挙げて更に詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

参考例1 カテプシンB阻害剤によるin vivo抗体産生の抑制

十分量の抗原を実験動物に単回投与すると、免疫後約10日目から特異的抗体が誘導され、その抗体価は約2~3週目に最高レベルに達する。抗原で動物を免疫する前にプロテアーゼ阻害剤を投与して、抗体産生が顕著に抑制され、抗体応答が遅延するならば、プロセッシングに関与する酵素が推定できるはずである。この考えに基づいて種々のプロテアーゼについて検討した。その結果、抗原の接種前後にシステインプロテアーゼ阻害剤、とりわけカテプシンB阻害剤（例えば、CA-074 (N-(L-3-トランス-n-プロピルカルバモイルオキシラン-2-カルボニル)-L-イソロイシル-L-プロリン；特開平4-139182、E-64 (N-(L-3-トランス-ε-トキシカルボニルオキシラン-2-カルボニル)-L-イソロイシン-メチルブチルアミド；大正製薬) など) を腹腔内に投与すると、接種した抗原に対する抗体の産生は阻害されることを見いだした。更に、カテプシンB阻害剤を抗原接種後に連日投与すると、抗体産生はほとんど完全に抑制された。これらの結果は抗原のプロセッシングにカテプシンBが関与していることを示唆し、またカテプシンB阻害剤は特異的な抗体産生を制御することができることを示している。

参考例2 抗原の再刺激による感作脾細胞のin vi

*in vitro*増殖に対するプロテアーゼ阻害剤の影響  
抗原で免疫した動物の脾細胞（感作脾細胞）を *in vitro*で当該抗原で再刺激すると、細胞は著しい増殖応答を示す。この実験系において、各種のプロテアーゼ阻害剤の増殖応答に及ぼす影響を調べた。すなわち、あらかじめ常法に従って免疫感作したマウスの脾細胞を *in vitro*で当該抗原で再刺激する際に、各種プロテアーゼを添加し増殖応答を調べた。その結果システインプロテアーゼ阻害剤、とりわけカテプシンB阻害剤を添加すると、脾細胞の増殖応答は著しく阻害されることを見いだした。また、脾細胞を免疫する際に、システインプロテアーゼ阻害剤、とりわけカテプシンB阻害剤を同時に投与すると、感作脾細胞の当該抗原による再刺激による増殖応答が顕著に阻害された。さらに、カテプシンB共存下で免疫した脾細胞の再刺激時に当該阻害剤を添加すると、増殖はさらに抑制された。これらの結果は、抗原のプロセッシングにカテプシンBが関与していることを示唆している。

参考例3 抗原ペプチドの再刺激による感作脾細胞の *in vitro*増殖に対するプロテアーゼ阻害剤の影響  
抗原のプロセッシングに関与しているプロテアーゼであれば、そのプロテアーゼで分解された抗原ペプチドは感作脾細胞の増殖応答を促進させるはずである。この考えに基づいて種々のプロテアーゼで検討した結果、カテプシンB分解物に相当する合成ペプチド（活性型ペプチド）は感作脾細胞の増殖応答を促すが、他のドメインに相当する合成ペプチドではこのような脾細胞の増殖応答はみられないことを見いだした。また、この活性型ペプチドによる増殖応答はカテプシンB阻害剤によって阻害されなかった。これらの結果は、この活性型ペプチドがカテプシンBの分解によって生成されたものであることを示している。

参考例4 抗原によるヒトT細胞の増殖応答に及ぼすカテプシンBの阻害効果

X線照射を受けた末梢血単核細胞（R<sub>x</sub>-PBMC；増殖はできないが抗原提示はできる細胞）の存在下において、ヒトT細胞クローン（例えば、クローン2C5とB8など）はワクチンによって高い増殖応答を示し、また、ウイルスの糖蛋白質由来のペプチド及び核蛋白質由来のペプチドによってそれぞれ促進される。この系において、各種プロテアーゼによるT細胞クローンの増殖作用を検討した。その結果、応答はシステインプロテアーゼ阻害剤、とりわけカテプシンB阻害剤によって用量依存的に抑制されたが、当該ワクチンで前処理されたR<sub>x</sub>-PBMCを抗原提示細胞（APC）として用いると、この増殖応答はカテプシンB阻害剤で抑制されない。また、抗原ペプチドによる増殖応答はB阻害剤によって抑制されなかった。また、ワクチンに対するヒトT細胞クローンの増殖応答はカテプシンB特異的抗体と共にインキュベーションすることによって抑制され、カテプシン

Bの特異的基質〔例えば、Z-RR-MCA（ベンジルオキシカルボニル）-アルギニル-アルギニル、メチルクマリンアミド）など〕により抗原応答は強力に抑制された。MCAにはそのような作用はみられない。以上の結果は、カテプシンBが抗原のプロセッシングに関与するプロテアーゼであることを示唆している。

参考例5 *in vivo*での免疫応答におけるカテプシンB阻害剤の効果

動物カテプシンBの存在下あるいは非存在下においてアジュバントとともにカテプシンBで処理して得られた活性型抗原ペプチドで感作した。その結果、抗原ペプチドによる免疫応答はカテプシンB阻害剤によって抑制されないことが判明した。結果は、カテプシンB阻害剤は抗原のプロセッシング以外の免疫応答の過程を阻害しないことを示している。

参考例6 カテプシンBによってプロセスされた抗原ペプチドとクラスII MHC分子との結合

カテプシンBとクラスII MHCのアミノ酸配列を比較した。その結果カテプシンBの活性部位の一つ、VN<sub>217-223</sub>（VANSWNT）はクラスII MHCβ鎖の結合ドメインの一部、VN<sub>57-63</sub>（VAESWNS）と相同性を示すことを見出した。この相同性配列内の特にアラニン残基とアスパラギン残基はカテプシンBではクラスII MHC分子と同一配列であるが、これらのアミノ酸残基は他のカテプシンではそれぞれリジン残基とグリシン残基に置換されている。この事実から、カテプシンBによって分解された抗原ペプチドがクラスII MHC分子とより特異的に結合することが分かる。すなわちクラスII MHC分子と共通の親和性を示す抗原ペプチドにおけるC末端ドメイン配列はカテプシンBの基質特異性によって規定される。またクラスII MHC分子から単離された公知の抗原ペプチドの配列の大多数〔A. Y. Rudensky ら、ネイチャー（Nature）、第353巻、第622頁（1991）；同誌、第359巻、第429頁（1992）；K. Falkner ら、同誌、第351巻、第290頁（1992）〕は、カテプシンBとの親和性配列を含有していることから、上記の考察を裏付けている。

実施例1 *in vivo*におけるHBs抗原に対する抗体産生に及ぼすカテプシンB阻害剤の影響

BALB/cマウス（8～10週齢）にHBs抗原（かけつ研製薬）1匹あたり4μgを腹腔内に単回投与した対照群と抗原接種の前後2時間目にカテプシンB阻害剤E-64（大正製薬）あるいはCA-074（200μg/マウス）を腹腔内に投与し、同様に免疫した投与群の、抗HBs抗体価を酵素免疫測定法（ELISA；アボット社製）で測定した。得られた結果を〔図2〕に示す。図中データは平均値±標準偏差（SD）で表わした。また●はE-64a投与群を□を、△はCA-07

4 投与群を、○は対照群（生理食塩水）を、□は14日間のCA-074連続投与群をそれぞれ示す。図に示すとおり対照群では、抗HBs抗体価は接種後10日目に200mIU/mlになり、21日目に最高レベル（800mIU/ml）に達した。一方、投与群では抗HBs抗体の産生は抑制され、抗体応答は遅延した。この抑制の度合いは接種後14日目に最大であった。すなわち、阻害剤非投与の対照群は500mIU/mlの抗体価であったのに対し、CA-047あるいはE-64aの投与群では250mIU/mlであった。更に、カテプシンB阻害剤CA-074を抗原接種後14日間にわたって連日投与すると、抗体産生は顕著に抑制されて14日目に120mIU/mlの抗体価に達したにすぎなかった（阻害剤非投与群の抗体価は500mIU/ml）。

実施例2 HBs抗原の再刺激によるin vitro感作脾細胞増殖応答のカテプシンB阻害剤による抑制

実施例1に示したようにBALB/cマウスを4μgのHBs抗原で免疫した後、14日目に感作脾細胞（ $1 \times 10^5$ ）を調整し、これに1gμ/mlのカテプシンE-64aあるいはCA-047及び4gμ/mlのHBs抗原を加え72時間インキュベーションした（HBs抗原での再刺激）。反応後細胞を1μCiの $^3\text{H}$ -チミジンで12時間標識した後、 $^3\text{H}$ -チミジンの取り込みを測定した。得られた結果を表1に示す。表中データは5検体の平均値±SD（cpm）及び増殖指標（括弧内の数値）で表した。

$P < 0.05$ ；対照グループと有意差（スチューデントのt-テスト）。

表1に示すように対照群の感作脾細胞ではHBs抗原の再刺激によって増殖応答を示し、 $^3\text{H}$ -チミジンの取り込みは4092cpmであった。一方、カテプシンB阻害剤CA-074及びE-64aの存在下では、この細胞増殖応答は、それぞれ2112cpmおよび1980cpmまで著しく抑制され、対照群の増殖応答に比べて52%～48%まで低下した。HBs抗原でマウスを感作する際に同時にE-64aあるいはCA-047を投与して得られた脾細胞は抗原の再刺激に対してそれぞれ550cpmあるいは464cpmと非常に弱い増殖 \*

\* 応答しか示さなかった。また、この増殖応答は再刺激時にE-64aあるいはCA-074を添加することによってさらに抑制された。

実施例3 HBs抗原ペプチドの再刺激によるin vitro感作脾細胞増殖応答のカテプシンB阻害剤による抑制

カテプシンBの基質特異性からHBs抗原（図3）（配列番号3）はカテプシンBによってアミノ酸残基79と80の間で最も分解されやすいと推定されたが、実際に

10 カテプシンBの精製標品によってこの結合はin vitroで分解された。次にHBs抗原分子のN末端側アミノ酸残基番号第64～79番のアルギニン残基までの16アミノ酸残基からなるペプチドSR<sub>64-79</sub>（SCPPICPGYRWMCLRR）（配列番号3のアミノ酸残基番号第64～79の配列）、第64～94番の31アミノ酸残基からなるペプチドSL<sub>64-94</sub>（SCPPICPGYRWMCLRRFIIIFIFILLCLIFL）（配列番号3のアミノ酸残基番号第64～94の配列）及び第93～112番の20アミノ酸残基からなるペプチドFG<sub>93-112</sub>（FLLVLLDYQGMPLPVCPLLP）（配列番号3の配列のアミノ酸残基番号第93～113の配列）をそれぞれ常法に従いアプライドバイオシステム モデルA4311ペプチド合成機を用いて自動合成した。得られたペプチド各1gμ/mlについて、実施例2に記載の方法に準じて、HBs抗原感作脾細胞に対する増殖応答を測定した

20 【表1】。【表1】に示すように感作脾細胞に対してペプチドSR<sub>64-79</sub>は、最も強力な増殖応答（2568cpm）を示したが、HBs抗原分子における他のドメインのペプチドSL<sub>64-94</sub>及びFG<sub>93-112</sub>

30 は同一の系において極めて弱い増殖応答（それぞれ1626cpm及び556cpm）しか示さなかった。またペプチドSR<sub>64-79</sub>による増殖応答はカテプシンB阻害剤CA-074によって全く阻害されなかった。これらの結果より、SR<sub>64-79</sub>配列はHBs抗原において抗原性の強力なペプチドの一つであり、この断片はHBs抗原のカテプシンBによる分解によって生成されると結論した。◎

【表1】

		再刺激時のT細胞の $[^3\text{H}]$ チミジン取り込み (cpn)				
		N	HBsAg	HBsAg + E-64a	HBsAg + CA-074	
実施例2	対照	142±48 (1)	412± 57 (2.9)	213± 65 (1.5)	190±50 (1.4)	
	HBsAg	440±64 (1)	4029±540 (9.3)	2112±660 (4.8)	1980±360 (4.5)	
	HBsAg + E-64a	214±58 (1)	550±124 (2.3)	481±143 (2.0)	410±185 (1.7)	
	HBsAg	183±41 (1)	5475±439 (30)	1336±328 (7.3)	1841±210 (10)	
	HBs + CA-074	113±38 (1)	464±85 (4.1)	184± 23 (1.6)	206± 58	
		N	SR <sub>54-57</sub> - CA-074 + CA-074	Sl <sub>54-94</sub>	FG <sub>93-112</sub>	
	HBsAg	428±56 (1)	2568±410 (6.0)	2482±550 (5.8)	1626±359 (3.7)	556± 66 (1.2)

### N：抗原無添加

実施例4 狂犬病ワクチンあるいは抗原ペプチドの再刺激によるヒトT細胞クローンの増殖応答に及ぼすカテプシンB阻害剤E-64d及びCA-074の阻害効果

(1) X線照射(3000rad)処理された末梢血単核細胞(Rx-PBMC;  $1 \times 10^5$ /ウエル; 増殖はしないが、抗原提示能はありT細胞を刺激することができる細胞)の存在下においてヒトT細胞クローン2C5( $3 \times 10^4$ /ウエル)完全培地(10%ヒトAB血清添加RPMI)に0.05~0.4 $\mu\text{g/ml}$ の各種濃度の狂犬病ウイルス(Merieux, Lyonフランス)及び1.25, 2.5及び5 $\mu\text{g}$ の各濃度のカテプシンB阻害剤(E-64d又はCA-074)を添加し、5%炭酸ガス下、37℃で72時間保温し反応させた。狂犬病ワクチンで前処理したRx-PBMC(抗原提示状態)を用いて同様の測定を行った。反応終了前16時間1 $\mu\text{Ci}$  [ $^3\text{H}$ ]ーチミジン/ウエルを取り込ませ、T細胞の [ $^3\text{H}$ ]ーチミジンを指標として増殖応答を測った。カテプシンB阻害剤としてE-64dおよびCA-074を用いて得られた結果をそれぞれ〔図3〕および〔図4〕に示す。〔図4〕及び〔図5〕に示すとおり、カテプシンB阻害剤無添加の対照試料では、0. \*50

\*2 $\mu\text{g/ml}$ の狂犬病ワクチン(Merieux, Lyon, フランス)といずれも高い増殖応答を示し、この2C5クローンの増殖応答はE-64dあるいはCA-047の添加によって用量依存的に抑制された。また前処理したRx-PBMCを用いたときは、点線で示すようにカテプシンB阻害剤で抑制されなかった。

(2) 上記(1)の狂犬病ワクチンの代わりに、同ワクチンの抗原ペプチドである狂犬病ウイルスの糖蛋白質由来のペプチドER<sub>281-299</sub>(EECLDALESTMTTKSVSFR)(配列番号4)を用いて、

40 (1)の方法に準じて測定した。その結果、Rx-PBMCの存在下においてヒトT細胞クローン2C5の増殖は、E-64添加〔図6〕およびCA-074添加〔図7〕のいずれによってもそれぞれ促進された。これら抗原ペプチドによる増殖応答はカテプシンB阻害剤E-64d及びCA-074によって抑制されなかった。〔図4~6〕において各記号は次のとおりである。

△ 前処理されたRx-PBMC+5 $\mu\text{g/ml}$ 阻害剤

○ Rx-PBMC+抗原+1.25 $\mu\text{g/ml}$ 阻害剤

× Rx-PBMC+抗原+2.5 $\mu\text{g/ml}$ 阻害剤

● Rx-PBMC+抗原+5 $\mu\text{g/ml}$ 阻害剤



## □ Rx-PBMC+抗原

## 実施例5 カテプシンB特異的抗体及びカテプシンBの基質によるT細胞増殖の阻害

ヒトT細胞クローン2C5 ( $3 \times 10^4$ ) は、各種濃度の抗カテプシンB抗体F(a b)' (Kominami, EとKatanuna, N ジャーナル オブ バイオケミストリー 第91巻 67-71頁記載の方法に従って調製した) 存在下において、X線照射(3000rad)処理された末梢血単核細胞(Rx-PBMC;  $1 \times 10^5$ )と0.2  $\mu$ g/mlの狂犬病ワクチンと共に72時間保温された。反応後細胞に1  $\mu$ Ci/wellの [ $^3$ H] -チミジン を12時間取り込ませた後、集め増殖応答を [ $^3$ H] -チミジンの取り込みを指標として測定した。その結果クローン2C5の狂犬病ワクチンに対する増殖応答は抗カテプシンB抗体F(a b)' とのコインキュベーションによって抑制された。また、カテプシンBの合成基質Z-RR-MCA (ベンジルオキシカルボニルアルギニルアルギニルメチルクマリルアミド) を添加すると、増殖応答は強く阻害された [図8]。

## 実施例6 感作脾細胞の増殖に及ぼす感作時のカテプシンB阻害剤の影響

カテプシンB阻害剤存在下あるいは非存在下でBALB/cマウス脾細胞を狂犬病ワクチンで感作し、得られた \*

\* 感作細胞について、各種濃度の狂犬病ワクチン及びその抗原ペプチドER<sub>281-299</sub>による刺激時の増殖応答を測定した。狂犬病ワクチンで感作されたBALB/cマウス脾細胞は、in vitroでのワクチンあるいは合成ペプチドER<sub>281-299</sub>の刺激に対して強い増殖応答を示した。一方、CA-074あるいはE-64dの存在下において狂犬病ワクチンで感作した細胞は、in vitroでのワクチンあるいは抗原ペプチドER<sub>281-299</sub>に対する脾細胞の増殖応答は強力に抑制された [図9] および [図10]。

## 実施例7 カテプシンBの活性部位とクラスII MHC分子の抗原ペプチド結合ドメインの相同性

Rx-PBMCの存在下にT細胞クローン2C5を狂犬病ワクチンで感作する際にHBs抗原の抗原ペプチドSR<sub>44-79</sub>のC末端ペプチド(MCLRRあるいはYRWMCLRR; 100  $\mu$ g/ml) を添加すると、T細胞の増殖 ([ $^3$ H] -チミジンの取り込み) はこれらのペプチド非添加の対照のその75%あるいは60%にまで抑制された。この結果は、これらのペプチドがカテプシンBによる抗原提示を阻害し、またクラスII MHC分子への抗原ペプチドの結合を阻害することを示している。

## 【配列表】

配列番号(SEQ ID NO) : 1

配列の長さ(SEQUENCE LENGTH) : 7

配列の型(SEQUENCE TYPE) : アミノ酸(amino acid)

トポロジー(TOPOLOGY) : 直鎖状(linear)

配列の種類 (MOLECULE TYPE) : ペプチド(peptide)

ハイポセティカル配列(HIPOTHTICAL) : N o

フラグメント型(FRAGMENT TYPE) : 中間部フラグメント(ternal fragment)

配列(SEQUENCE DESCRIPTION):

Val Ala Asn Ser Trp Asn Thr

1 5

配列番号(SEQ ID NO) : 2

配列の長さ(SEQUENCE LENGTH) : 7

配列の型(SEQUENCE TYPE) : アミノ酸(amino acid)

トポロジー(TOPOLOGY) : 直鎖状(linear)

配列の種類 (MOLECULE TYPE) : ペプチド(peptide)

ハイポセティカル配列(HIPOTHTICAL) : N o

フラグメント型(FRAGMENT TYPE) : 中間部フラグメント(ternal fragment)

配列(SEQUENCE DESCRIPTION):

Val Ala Glu Ser Trp Asn Ser

1 5

配列番号 (SEQ ID NO) : 3

配列の長さ (SEQUENCE LENGTH) : 228

配列の型(SEQUENCE TYPE) : アミノ酸(amino acid)

トポロジー(TOPOLOGY) : 直鎖状(linear)

配列の種類 (MOLECULE TYPE) : ペプチド(peptide)

ハイポセティカル配列(HIPOTHTICAL) : N o

配列:

Met Glu Asn Thr Thr Ser Gly Phe Leu Gly Pro Leu Leu Val Leu Gln

[illegible]

配列番号(SEQ ID NO): 4

配列の長さ(SEQUENCE LENGTH): 19

配列の型(SEQUENCE TYPE): アミノ酸(amino acid)

トポロジー(TOPOLOGY): 直鎖状(linear)

配列の種類 (MOLECULE TYPE): ペプチド(peptide)

ハイポセティカル配列(HIPOTHTICAL): No

フラグメント型(FRAGMENT TYPE): 中間部フラグメント(ternal fragment)

配列(SEQUENCE DESCRIPTION):

Glu Glu Cys Leu Asp Ala Leu Glu Ser Thr Met Thr Thr Lys Ser Val

1

5

10

15

Ser Phe Arg

【図面の簡単な説明】

【図1】抗原提示におけるカテプシンBの作用の模式図である。

【図2】カテプシンB阻害剤共存あるいは非共存下でのHBs抗原による免疫に対する抗体産生量を示す。

【図3】HBs抗原のアミノ酸配列を示す。さらに、実施例3で用いた抗原ペプチドSR<sub>44-78</sub>に相当する部分をを四角で囲んだ。

【図4】カテプシンB阻害剤共存あるいは非共存下での抗原の再刺激に対するT細胞クローンの増殖応答を示す。

【図5】カテプシンB阻害剤共存あるいは非共存下での抗原の再刺激に対するT細胞クローンの増殖応答を示す。

【図6】カテプシンB阻害剤共存あるいは非共存下での \*

\* 抗原の再刺激に対するT細胞クローンの増殖応答を示す。

20 【図7】カテプシンB阻害剤共存あるいは非共存下での抗原の再刺激に対するT細胞クローンの増殖応答を示す。

【図8】抗カテプシンB抗体あるいはカテプシンB合成基質共存下での抗原の再刺激に対するT細胞クローンの増殖応答を示す。

【図9】カテプシンB阻害剤共存あるいは非共存下で抗原感作した脾臓細胞の抗原再刺激に対する増殖応答を示す。

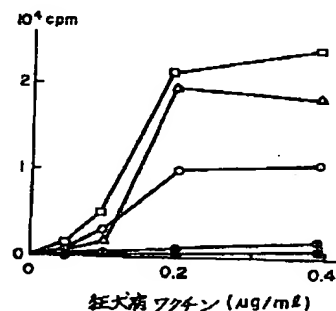
30 【図10】カテプシンB阻害剤共存あるいは非共存下で抗原感作した脾臓細胞の抗原再刺激に対する増殖応答を示す。

【図3】

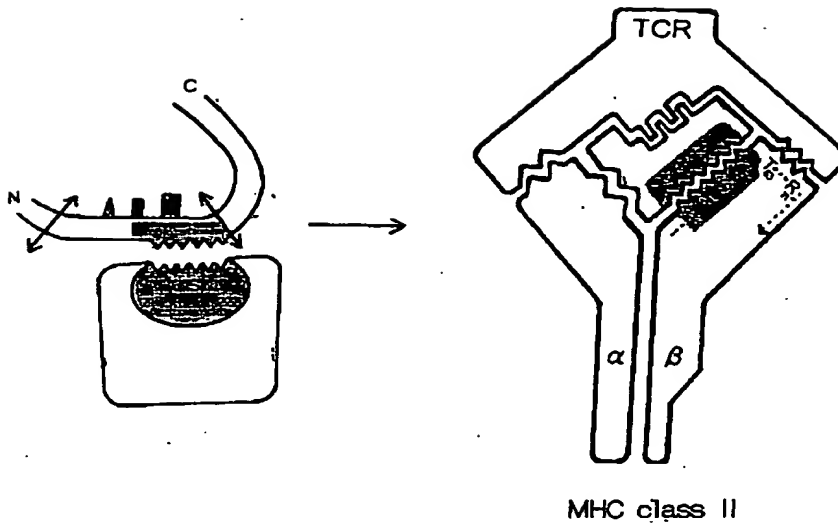
```

M E N T T S G F L G P L L V L Q A G F F
L L T R I L T T P Q S L D G W W T S L N
F L G G A P T C P G Q N S Q S P T S N H
S P T S C P P I C P G Y R W M C L R R F
I I F L F I L L L C L I F L L V L L D Y
Q G M L P V C P L L P G T S T T S T G P
C K T C T I P A Q G T S M F P S C C C T
K P S D G N C T C I P I P I P S S W A F A R
F L W E G A S V R E S W L S L L V P F V
Q W F V G L S P T V W L S V I W M M W Y
W G P S L Y N I L S P F L P L L P I F F
C L W V Y I
  
```

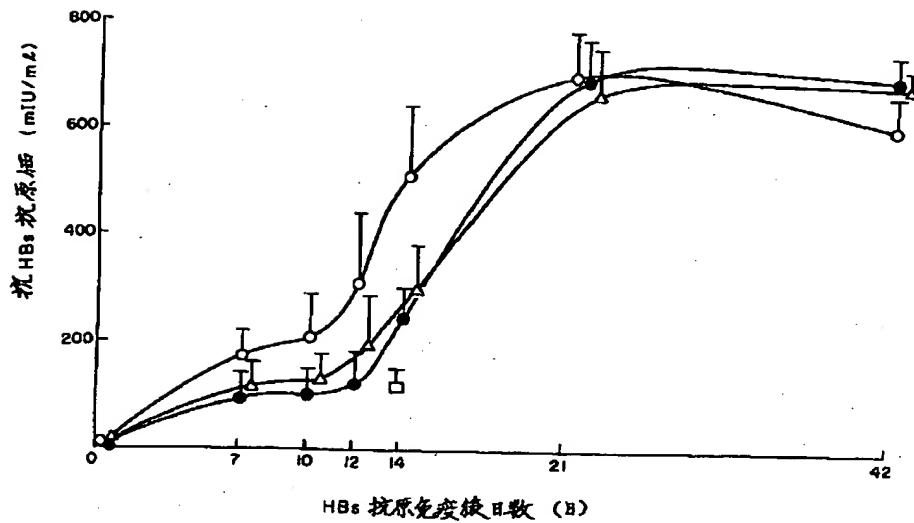
【図4】



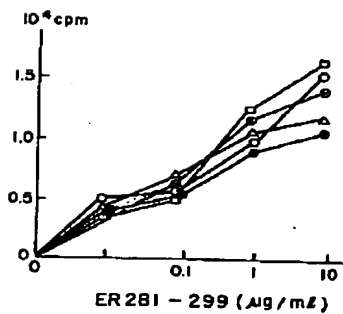
【図1】



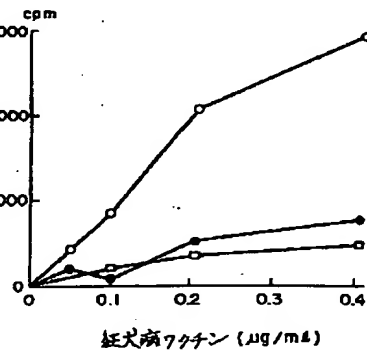
【図2】



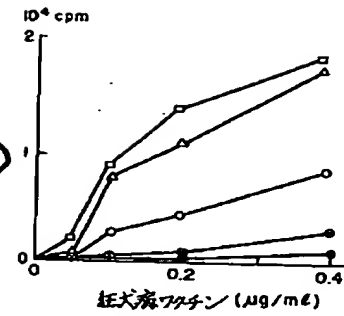
【図7】



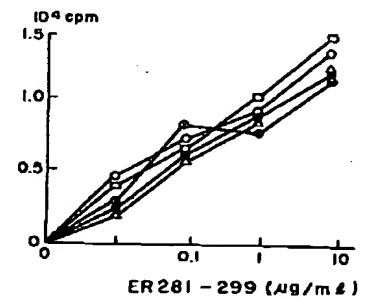
【図9】



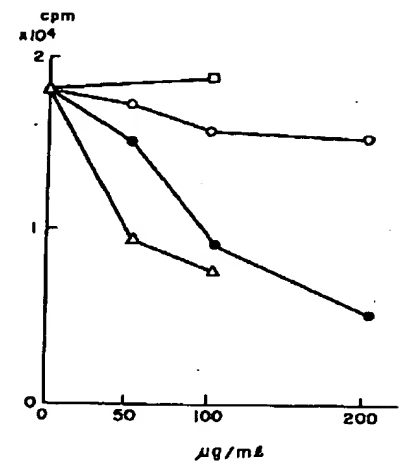
【図5】



【図6】



【図8】



【図10】

